

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—166124

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 49/00

識別記号

庁内整理番号  
7057—4C

③ 公開 昭和56年(1981)12月21日

発明の数 1  
審査請求 有

(全 3 頁)

⑭ 悪性腫瘍の診断用注射液

② 特 願 昭55—69363

② 出 願 昭55(1980)5月24日

② 発 明 者 片山 胖

京都市北区上賀茂深泥池町64の

⑦ 出 願 人 片山 胖  
京都市北区上賀茂深泥池町64の

⑦ 代 理 人 弁理士 多田 貞夫

明 細 書

1. 発明の名称

悪性腫瘍の診断用注射液

2. 特許請求の範囲

1. 細菌内毒素 (バクテリアル エンドトキシン, Bacterial Endotoxin) を有効成分とする悪性腫瘍の診断用注射液において、該診断用注射液がマグネシウム イオンを含有することを特徴とするもの

3. 発明の詳細な説明

本発明はヒトにおける悪性腫瘍の有無を恰も結核症におけるツベルクリン反応のように簡易な皮内反応によつて適確に診断することを可能にする、細菌内毒素 (バクテリアル エンドトキシン, Bacterial Endotoxin) を有効成分として含有する悪性腫瘍の診断用注射液において、それに微量のマグネシウム イオンを添加することによつてその注射液の試薬力価の安定性、保存性を高めて皮内反応の再現性を顕著に向上させると共にその反応によつて現れる発赤の

色調をより鮮明なものとしてヒトにおける悪性腫瘍の有無の検索をより確実に実施し得るよう改良した悪性腫瘍の診断用注射液に関する。

発明者らは先に、グラム陰性桿菌などからボワバン (Boivin) らの抽出方法などによつて得られた細菌内毒素、これはグラム陰性桿菌などの細菌の細胞膜の構成成分であつて化学的には高分子リボ多糖体であり、生物学的にはシュワルツマン活性のほかに多様な生物活性を営むものであるが、これを悪性腫瘍をもつ動物に注射すると悪性腫瘍組織のみに選択的に出血壊死が起るという現象 (コント・ランド・ソシ・ビヨル, Compt. Rend. Soc. Biol., 第108巻、1931年、第427頁参照) の解析から出発し、悪性腫瘍をもつ宿主はその全体が細菌内毒素に対する感受性を昂進させた状態にあることなどを総合、検討した結果、ヒト病患者においては正常人に比較して皮内注射された細菌内毒素に対する反応性が高まることに着目し、ヒトの

皮内にごく微量の細菌内毒素を注射してその注射箇所における一定時間後の発赤の大きさを測定することによつてヒトにおける悪性腫瘍の有無を容易に検索し得ることを実証した(特願昭53-51097号参照)。

しかしこの場合、局所の発赤以上には副作用を生じさせないようにするためにあつてごく微量(約40ng)の細菌内毒素を含む溶液を皮内注射に用いるのであるが、極めて稀薄な溶液となるために試薬の安定性が低く、冷蔵庫に2ヶ月程も保存すると試薬の力価が低下し、注射液の反応性が劣化するという欠点が屢々見受けられた。この欠点は注射液用の生理食塩水を作製するときに蒸留水として純度のより高いものを用いるほど注射液の反応性の劣化現象が顕著に進行するという傾向にもあつた。

発明者はこのような欠点を解消して長期間保存しても安定した反応性を有する細菌内毒素を有効成分とする悪性腫瘍の診断用注射液を得べ

く種々研究した結果、その注射液にマグネシウムイオンを約10~100 $\mu$ M(0.01~0.1ミリモル)の濃度に含有させることによつて6ヶ月間冷蔵庫中に保管しても試薬力価の低下が皆無である程度にその注射液の試薬力価の低下を有効に防止し、注射液の反応性を恒常的なものに維持できると共に注射液の皮内反応によつて生じる局所の発赤もその色調をより鮮明にすることができて反応結果の観察、測定を容易かつ確実になし得ることを見出したものである。そしてこのように注射液の反応性を恒常的なものに維持できると共に皮内反応の観察、測定を容易、確実とすることによつて特別な装置、器具を必要とせずにもまた別段の訓練、熟練を要することもなく大勢の人の中から癌患者を発見するための試験が至極簡便に実施できるようにしたものである。

以下に本発明の実施例並びにその試験例を挙げて更に詳述する。

0.25規定のトリクロール酢酸溶液を用いるボワバン(Boivin)らの抽出方法(細菌を集菌、洗滌し、蒸留水に浮遊させ、等量の0.5規定のトリクロール酢酸溶液を加えた後、氷冷しながら3時間振とうして抽出したうえ、遠心分離に付して得た上澄液を中和し、ついで水道水に対して透析し、更に濃縮した後、3倍量のエタノールを加えて得た沈澱を集め、凍結乾燥することによつて得る方法)(ゴント・ランド・ソシ・ビヨル, Compt. Rend. Soc. Biol., 第113巻、1933年、第429~436頁参照)とか、45%フェノール溶液を用いるウエストファール(Westphal)らの抽出方法(細菌を集菌、洗滌し、蒸留水に浮遊させ、等量の90%フェノール溶液を加えた後、68°Cで30分間振とうし、後氷冷したうえで冷凍遠心に付し、水層を集め、透析するかエーテルを添加することによつてフェノール分を除去し、ついで濃縮した後、数倍量のエタノールを添加して生じる

沈澱を集め、この沈澱を蒸留水に浮遊させ、等量のエタノールを加えて生じる沈澱を除去する。そしてこのときの上澄液を必要あれば適宜濃縮したうえ、それに5倍量のエタノールを添加し、生じた沈澱を蒸留水に浮遊させ、凍結乾燥することによつて得る方法)(ツェット・ナツールフォルシュ・ゼクト・ベー, Z. Naturforsch. Sect. B., 第7巻、1952年、第149~155頁参照)などの方法によつて培養細菌、例えば大腸菌055株、から細菌内毒素を抽出し、ついでMgCl<sub>2</sub>を50 $\mu$ M(0.05ミリモル)の濃度に添加し、かつ防腐剤としてのフェノールを0.5%の濃度に添加した滅菌生理食塩水に、その1ml当りに200ngの濃度となるように上記細菌内毒素を含有させたいうえで80°Cに20分間加熱して完全滅菌し、本発明に係る注射液を得るものである。

大腸菌055株から前述のボワバンらの抽出方法によつて得られた細菌内毒素を用いた上記

本発明に係る注射液の0.2 ml宛を正確に各被験者の上膊屈側面正中線上に皮内接種してその4時間後の接種箇所の発赤の直径を測定し、その最大直径が2.1 mm以下のものを(-)、2.2 mm以上のものを(+)とする判定方法によつて得た試験結果は、

50名の癌患者中では(+)となつたものが46名で、その陽性率が92%となり、また41名の正常人に対しては40名が(-)でその陰性率が97.5%という適確な成績となつた。この成績は従来の、マグネシウムイオンの添加されてない、細菌内毒素のみを生理食塩水中に含むものとか或いはそれに単に防腐剤としてのフェノールを0.5%の濃度に添加しただけのものである注射液を使用した場合に比較して勝るとも決して劣るものではない。

更に、この大腸菌055株から得られた細菌内毒素を用いた本発明に係る注射液の同一のものを正常同一人の左右上膊の屈側面正中線上の

4ヶ所に同時に前述同様の0.2 ml宛の皮内接種を試みたところ、夫々の発赤の最大直径が例えば1.6 mm, 1.6 mm, 1.6 mm, 1.6 mmとなり、再現性に極めて優れた反応結果が得られた。

更にまた、この本発明に係る注射液の同一のものを冷蔵庫中に保存しつつ正常人を対象として2週間置きに前述同様の0.2 ml宛の皮内接種を合計5回繰返したところ、各回の接種についての発赤の最大直径は例えば1.6 mm, 1.6 mm, 1.6 mm, 1.7 mm, 1.6 mmといったように常に、注射液の反応性についての時間の経過に伴つての変化の認められない、極めて恒常的な成績が得られた。従つて本発明に係る注射液によれば、前述の0.2 mlといった皮内接種の量を正確に守つて接種することに充分注意しさえすれば、従来の細菌内毒素のみを生理食塩水中に含むもの或いはそれに単に防腐剤としてのフェノールを0.5%程度の濃度に添加しただけの注射液を使用した場合にまさ遭遇したような、注射液の

保存中にその試薬力価が低下して保存期間の経過と共に再現性のある結果が得難くなるといったことには一切懸念を要することなく、極めて容易に再現性のある判定結果を得ることが出来るものである。

なお、前述のごとく本発明の注射液にはフェノールを微量に含有させているが、これは前述のごとく防腐剤としての役割以外には別段の意味を有するものではなく、因みにフェノールの0.5%溶液の0.2 mlを同様に上膊屈側面正中線上に皮内接種してみても、正常人と癌患者を問わずに数時間後に最大直径が1.0 mm以下の弱い発赤を生ずるだけである。

また本発明の注射液の毒性について、診断用投与量の10倍以上にも相当する500 mgの前述の大腸菌055からの細菌内毒素を含有し、かつマグネシウムイオン及びフェノールを夫々100 µM及び0.5%の濃度に含有する滅菌生理食塩水を発明者自身に週三回皮下注射し、こ

の投与を10週間継続して検べた結果では、注射箇所にも多少の痛みとか腫れが生じたほかは別段の毒作用は全く認められなかつた。

以上のごとく本発明に係る、有効成分たる細菌内毒素にマグネシウムイオンを共存させるようにして製した注射液はヒトにおける悪性腫瘍の有無の判定をより確実に行えるようにすると同時に注射液の薬効を長期に亘つて安定させるものであるから、癌患者の診断とか多数の人々の中から癌についての精密検査を必要とする少数の人を選び出すスクリーニングなどに甚だ有利、有益な手段を提供することになる。

特許出願人 片山 胖

代理人 多田貞夫

